

PCI/EP 10/5254809
4 FEB 2003

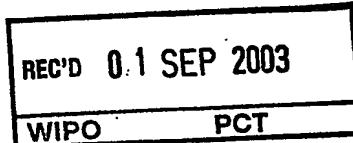
BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1 (a) OR (b)

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 102 39 739.2



Anmeldetag: 29. August 2002

Anmelder/Inhaber: LEICA Mikrosysteme GmbH, Wien/AT

Bezeichnung: Vorrichtung und Verfahren zur Durchführung von
immunologischen Markierungstechniken für
Gewebedünnschnitte

IPC: G 02 B 21/34

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 8. Mai 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Wehner

Best Available Copy

Vorrichtung und Verfahren zur Durchführung von immunologischen Markierungstechniken für Gewebedünnsschnitte

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Behandlung von Gewebedünnsschnitten auf einer Trägerplatte mit mindestens einer Behandlungsflüssigkeit.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Behandlung von Gewebedünnsschnitten auf einer Trägerplatte mit mindestens einer Behandlungsflüssigkeit.

Um die Struktur von biologischen Proben, wie Geweben oder Zellen im Elektronenmikroskop untersuchen zu können, werden Ultradünnsschnitte von nur wenigen nm Größe angefertigt, die auf Objekträgernetze aus Metall (im folgenden als Metallnetzchen bezeichnet), bevorzugt aus dem Metall Nickel aufgebracht werden. Für die elektronenmikroskopische Untersuchung werden die Schnitte kontrastiert oder durch spezielle oder cytochemische Verfahren einzelne Bestandteile der Probe markiert. Häufig beruhen diese cytochemischen Verfahren auf dem Prinzip der Ligandenpaarbildung, wobei ein erster Ligand in der biologischen Probe enthalten sein kann und der zweite Ligand dann, wenn er mit dieser Probe in Kontakt kommt, als Bindungspartner an den ersten Ligand bindet. Beispiele für Ligandenpaare auf biologischer Basis stellen Antigen/Antikörper-Bindungspaare, Enzym/Substrat- Bindungspaare, Lektine/Zucker, Hormon/Rezeptor-Systeme, DNA/DNA- und DNA/RNA-Paare dar.

- Im Stand der Technik sind zahlreiche Verfahren bekannt, bei denen das Antigen/Antikörper-Bindungspaar beteiligt ist, sie werden unter dem Begriff der Immunhisto- und Immuncytochemie zusammengefasst (im folgenden als immunologische Markierungstechniken bezeichnet). Das
- 5 US-Patent 5,143,714 offenbart beispielsweise ein Verfahren, das ein Antigen aus einer flüssigen Probe in einer pelletierbaren Gelsubstanz adsorbiert. Das Gelpellet wird mit einer Diffusionsbarriere umgeben, als Block in eine ausgestanzte Gelmatrix integriert und im Folgenden wie eine Gewebeprobe immunologischen Markierungstechniken unterzogen.
- 10 Die DE 38 78 167 T2 beschreibt die Verwendung von kolloidalen Goldteilchen zur Markierung von Liganden in der Immunogold Staining Technique. Ein stark verbessertes Verfahren, das die qualitative und quantitative Auswertung eines Antigens in einer Probe erlaubt, offenbart das US-Patent 5,079,172 mit einem Sandwich-Assay, indem der
- 15 das Antigen bindende erster Antikörper mit einem Gold markierten zweiten Antikörper, der den ersten Antikörper bindet, markiert wird. Im elektronenmikroskopischen Auswerteverfahren kann anhand der Menge der Goldpartikel das Antigen der Probe qualitativ und quantitativ ermittelt werden.
- 20 Vielen Protokollen der Immunhisto- und Immuncytochemie zur immunologischen Markierung von Gewebedünnsschnitten ist gemeinsam, dass sie meist aus 10 bis 20 einzelnen Verfahrensschritten bestehen. Zu einem Großteil bestehen die Verfahrensschritte aus Waschvorgängen der zu untersuchenden Probe mit Puffer- oder Markierungslösung.
- 25 Diese Waschvorgänge werden derzeit in einem aufwendigen Prozess manuell durchgeführt, wobei mit einer Pipette einzelne Tropfen der wässrigen Puffer- oder Markierungslösung auf eine hydrophobe Unterlage (z.B. Parafilm®, Parlodion®, Colloidion oder Formfan®) aufgebracht werden. Die Metallnetzchen mit den Gewebedünnsschnitten werden nach unten einzeln darauf gelegt, um mit der Behandlungsflüssig-
- 30

- keit zu reagieren. Wegen des geringen Gewichts des Metallnetzchens und der Oberflächenspannung des Flüssigkeitstropfen, schwimmt das Metallnetzchen dabei auf der Tropfenoberfläche. Nach einer bestimmten Verweildauer für diesen Schritt (häufig 5-10 min) wird das
- 5 Metallnetzchen mit einer Pinzette zum nächsten Tropfen weiter transportiert. Dieser Vorgang wird bis zur letzten Position des Standardprotokolls fortgeführt und bindet eine Arbeitskraft bis zu mehreren Stunden pro immunologischer Markierungsreaktion.
- Es ist leicht ersichtlich, dass dieser manuelle Prozess kontinuierliche
- 10 Aufmerksamkeit des Arbeitspersonals fordert und durch den großen Zeitaufwand hohe Arbeitskosten mit sich bringt. Die Zahl der gleichzeitig zu bearbeitenden Proben ist stark limitiert und Fehler seitens des Arbeitspersonals beim exakten Pipettieren und Positionieren der Flüssigkeitstropfen mit kleinsten Volumina nicht auszuschließen. Das manuelle Verfahren kann eine Verwechslung der Proben nach der langen Behandlungszeit während der immunologischen Markierung nicht ausschließen, dies könnte durch Verwendung eines Probenträgers mit Kennzeichnung in Form eines Chips oder Barcodes, wie es in dem Gebrauchsmuster DE 299 06 382 U1 dargestellt ist, verhindert werden.
- 15 Zusätzlich stellt die Verdunstung der Flüssigkeitstropfen bei länger dauernden Standardprotokollen ein großes Problem dar.
- Zwar offenbart das Gebrauchsmuster DE 298 17 912 U1 eine Vorrichtung zum Waschen von mikroskopierbaren Präparaten auf Trägern nach immunocytochemischer Behandlung, allerdings handelt es sich
- 20 hierbei um eine Waschbox in der eine größere Menge an Waschlösung mit einer gewissen Strömungsgeschwindigkeit über Präparat und Träger hindurchströmt. Für die Durchführung von immunologischen Markierungstechniken selber ist diese Vorrichtung nicht geeignet, da die verwendeten antikörperhaltigen Markierungslösungen sehr teuer sind
- 25 und daher nur in möglichst geringen Volumina eingesetzt werden.

Bisher ist kein Gerät und kein Verfahren bekannt, das den Vorgang der Durchführung von immunologischen Markierungstechniken für Gewebedünnschnitte zufriedenstellend automatisiert.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, eine geeignete Vorrichtung zur Behandlung von Gewebedünnschnitten bereitzustellen, die es erlaubt effektiv, annähernd automatisch und zeitsparend mehrere Gewebedünnschnitte in reproduzierbarer Qualität gleichzeitig zu bearbeiten.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß mit einer Vorrichtung gelöst, die die Merkmale Anspruchs 1 umfasst.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es ein Verfahren zur Behandlung von Gewebedünnschnitten für die Durchführung von immunologischen Markierungstechniken bereitzustellen, das es erlaubt effektiv, annähernd automatisch und zeitsparend mehrere Gewebedünnschnitte in reproduzierbarer Qualität gleichzeitig zu bearbeiten.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß mit einem Verfahren gelöst, das Merkmale des Anspruchs 22 umfasst.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung besteht im wesentlichen aus zwei Teilen, einer Trägerplatte, auf der Metallnetzchen platziert und mittels Magnet gehalten werden und einem Objektträger der Vertiefungen (so genannte „wells“) enthält, die mit mindestens einer Flüssigkeit (Behandlungsflüssigkeiten zur immunologischen Markierung oder Waschlösungen jeweils nach dem Stand der Technik) gefüllt werden können. Die Positionen der Vertiefungen entsprechen dabei in ihrer Anordnung gegenüberliegend den Positionen der Metallnetzchen auf der Trägerplatte. Beide Teile der Vorrichtung können in einer Anordnung in eine Transportvorrichtung mit steuerbarer Hebe- und Senkfunktion so eingelegt werden, dass die Trägerplatte mit den Metallnetzchen von oben wie ein Stempel mit den Flüssigkeitstropfen in den Vertiefungen des

Objektträgers in Berührung kommt. Dieser Vorgang ermöglicht eine Automatisierung von immunologischen Markierungsverfahren für Gewebedünnschnitte für elektronenmikroskopische Untersuchung. Mehrere Objektträger können automatisch einer Behandlungsposition zugeordnet werden und auf einer einzelnen Trägerplatte können eine Vielzahl von Metallnetzchen angebracht sein, so dass sich die Anzahl der gleichzeitig zu bearbeitenden Proben deutlich erhöht. Die Vorrichtung zur Behandlung von Gewebedünnschnitten besitzt mindestens eine Trägerplatte, wobei die Gewebedünnschnitte mit mindestens einer Behandlungsflüssigkeit behandelt werden. Gegenüberliegend zu der Trägerplatte ist mindestens ein Objektträger in einer Behandlungsposition angeordnet. Mehrere der Objektträger sind in diese Behandlungsposition automatisch überführbar. Die Trägerplatte definiert eine Unterseite, an der markierte Positionen ausgezeichnet sind, an denen Metallnetzchen mit Gewebedünnschnitten positioniert sind. Ebenso definiert die Trägerplatte eine Oberseite, in der mehrere Bohrungen ausgebildet sind, in denen jeweils ein Magnet steckt. Die Bohrungen sind derart angebracht, dass sie den markierten Positionen gegenüberliegen. Der Objektträger definiert eine Oberseite, die freie Vertiefungen enthält, die zur Aufnahme von Behandlungsflüssigkeit ausgebildet sind.

Die Erfindung wird im folgenden anhand der in den Figuren schematisch dargestellten Beispiele verdeutlicht. Dabei zeigen:

- Fig. 1: eine perspektivische Ansicht einer Trägerplatte, die Metallnetzchen trägt;
- 25 Fig. 2: eine perspektivische Ansicht eines Objektträgers mit Vertiefungen, die mit mindestens einer Behandlungsflüssigkeit gefüllt werden können;
- Fig.3 eine Detailansicht der Trägerplatte und des Objektträgers im Querschnitt;

- Fig. 4: eine Draufsicht einer Ausführungsform eines Objektträgers,
- Fig. 5 eine perspektivische Ansicht der Transportvorrichtung zum Aufbringen der Trägerplatte auf den Objektträger;
- 5 Fig. 6 eine schematische Darstellung der Trägerplatte, die durch die Transportvorrichtung annähernd in Kontakt mit einem Objektträger ist;
- Fig. 7 eine schematische Darstellung der Kammer als Verdunstungsschutz der Flüssigkeitstropfen auf den Objektträgern; und
- 10 Fig. 8 eine schematische Darstellung einer anderen Ausführungsform der Kammer als Verdunstungsschutz der Flüssigkeitstropfen auf den Objektträgern.
- Fig. 1 zeigt eine erfindungsgemäße Trägerplatte 1, die eine Oberseite 1a und eine Unterseite 1b definiert. Auf der Unterseite 1b besitzt die Trägerplatte 1 markierte Positionen, an denen Metallnetzchen 2 mit Gewebedünnnschnitten (hier nicht dargestellt) positioniert sind. Bevorzugter weise sind die Positionen der Metallnetzchen 2 auf der Trägerplatte 1 erhöht. Damit wird verhindert, dass beim Kontakt mit den Flüssigkeitstropfen Flüssigkeitsbrücken zwischen den einzelnen Metallnetzchen 2 entstehen. An der Oberseite 1a der Trägerplatte 1 befinden sich entgegengesetzt zu den Positionen der Metallnetzchen 2 Bohrungen 3a (siehe Fig. 3), in denen Magnete 3 z. B. Permanentmagnete stecken. Sie bewirken, dass die Metallnetzchen 2 auf der Unterseite 1b der Trägerplatte 1 durch magnetische Kraft auf ihrem Platz gehalten werden. Der Abstand zwischen Metallnetzchen 2 und Magnet 3 soll möglichst gering (Abstand < 2 mm) gehalten werden. Die Trägerplatte 1 besteht vorzugsweise aus formstabilem, nicht magnetischen Material, vorzugsweise aus Aluminium, Messing, faserverstärkte Kunststoffe und ist vor-

teilhafter weise auf der Unterseite 1b, die die Metallnetzchen 2 trägt, hydrophob beschichtet (z.B. mit einer Teflondruckbeschichtung). Es ist für einen Fachmann selbstverständlich, dass für Form der Trägerplatte 1, sowie die Anordnung der Metallnetzchen 2 auf der Trägerplatte 1 zahlreiche Ausführungsformen möglich sind. In der hier dargestellten Ausführungsform sind auf einer rechteckigen Platte mit den Maßen ca. 76 X 26mm (3 X 1 Inch; Objektträgergröße) beispielsweise 10 x 3 Metallnetzchen 2 untergebracht, die einen Durchmesser von 3 mm aufweisen. Entscheidend ist, dass die Positionen der Metallnetzchen 2 auf der Unterseite 1b der Trägerplatte 1 den Bohrungen für die Magnete 3 auf der Oberseite 1a der Trägerplatte 1 gegenüberliegen und vorzugsweise auch den Positionen mindestens eines Flüssigkeitstropfens 6 auf der Oberseite 4a eines Objektträgers 4 (siehe Fig. 2) gegenüberliegen.

In einem weiteren Ausführungsbeispiel werden die Metallnetzchen 2 auf der Unterseite 1b der Trägerplatte 1 durch Elektromagnete (nicht dargestellt) gehalten.

Fig. 2 zeigt eine perspektivische Ansicht des erfindungsgemäßen Objektträgers 4, der eine Oberseite 4a und eine Unterseite 4b definiert. Der Objektträger 4 besitzt auf der Oberseite 4a mehrere Vertiefungen 5 (sogenannte „wells“), die in der gezeigten Ausführungsform in Reihe angeordnet und mit jeweils einem Flüssigkeitstropfen 6 gefüllt sind. Der Flüssigkeitstropfen 6 besteht aus einer Wasch- oder Behandlungslösung wie sie im Stand der Technik offenbart ist. Es ist vorgesehen, dass sich in den einzelnen Vertiefungen 5 auch unterschiedliche Flüssigkeiten befinden (z.B. eine Reihe von Vertiefungen 5 gefüllt mit Waschlösung, die nächste Reihe von Vertiefungen 5 gefüllt mit Markierungslösung). Der Objektträger 4 ist vorteilhafter weise transparent und besteht aus formstabilem Material. Vorzugsweise ist der Objektträger 4 aus Glas oder Kunststoff und ist auf der Oberseite 4a, die die Vertiefungen 5 trägt, und in den Vertiefungen 5 selber hydrophob beschichtet

(z.B. mit einer Teflondruckbeschichtung 5a). Die Vertiefung 5 ist ident mit der Dicke D (siehe Fig. 3) der Teflonbeschichtung 5a. Die Vertiefung 5 beträgt vorzugsweise etwa 50µm. Die Vertiefungen 5 tragen ein Flüssigkeitsvolumen, das bei Waschlösung etwa 50µl, bei Antikörpern 5 und Goldlösungen etwa 5µl beträgt. Die Teflondruckbeschichtung ist für verschiedene Tropfengrößen gleich. Durch die hydrophobe Rand- schicht wölben sich die Flüssigkeitstropfen 6 mehr oder weniger nach oben. Um die Netzchen mit diesen Tropfen in Berührung zu bringen, ist es für den Ablauf unbedingt notwendig die Tropfengröße zu kennen, da 10 die Tropfengröße eine unterschiedliche Position für die Absenkbe- gung der Metallnetzchen 2 ergibt.

Die räumliche Beziehung des Objektträgers 4 und der Trägerplatte 1 zueinander sind in Fig. 3 als Teilansicht im Querschnitt dargestellt. Die Teilansicht des Querschnitts ist z.B. in Fig. 2 durch die gestrichelte Li- 15 nie 32 definiert. In dem hier gezeigten Ausführungsbeispiel ist auf dem Objektträger 4 eine hydrophobe Beschichtung 5a aufgebracht, die eine Dicke D aufweist. In der Trägerplatte 1 sind Bohrungen 3a für Magnete 3 vorgesehen. Auf der Unterseite 1b der Trägerplatte 1 sind markierte Positionen 2a vorgesehen, von denen jeweils eine ein Metallnetzchen 2 trägt. Das Metallnetzchen 2 ist durch die den markierten Positionen 2a 20 zugeordneten Magnete 3 gehalten. Die gestrichelt-gepunktete Linie 29 in Fig. 3 verdeutlicht, dass die Trägerplatte 1 und der Objektträger 4 derart angeordnet sind, dass jeweils eine markierte Positionen 2a mit Metallnetzchen 2 einer Vertiefung 5 gegenüberliegt.

25 Fig. 4 zeigt den Objektträger 4 in der Draufsicht. Dabei ist eine weitere Ausführungsform des Objektträgers 4 dargestellt. Zur Kennzeichnung besitzt der Objektträger 4 vorteilhafter weise eine Kennzeichnung, wie es z.B. in dem Gebrauchsmuster DE 299 06 382 U1 dargestellt ist. Die Kennzeichnung 4c ist auf der Oberfläche 4a des Objektträgers 4 ange- 30 bracht und kann in Form eines Barcodes oder eines Chips ausgestaltet

sein. Dem Fachmann ist ersichtlich, dass es die für Größe und Form des Objektträgers 4, sowie die Anordnung der Vertiefungen 5 auf der Oberseite 4a des Objektträgers 4 zahlreiche Ausführungsmöglichkeiten gibt. Auf einer rechteckigen Fläche mit den Maßen 76 mm x 26 mm 5 können beispielsweise 10 x 3 Vertiefungen 5 einer Größe von 2 mm bis 3 mm enthalten sein. Entscheidend ist, dass die Positionen der Flüssigkeitstropfen 6 auf der Oberseite 4a des Objektträgers 4 in ihrer Anordnung den Positionen der Metallnetzchen 2 auf der Unterseite 1a der Trägerplatte 1 gegenüberliegen (siehe Darstellung Fig. 3).

10 Fig. 5 zeigt die erfindungsgemäße Trägerplatte 1 in einer Transportvorrichtung 20 mit steuerbarer Hebe- und Senkfunktion. Die Transportvorrichtung 20 ist derart ausgestaltet, dass mehrere Objektträger 4 mit der Trägerplatte 1 nacheinander in Kontakt gebracht werden können. Die Transportvorrichtung 20 wird derart gesteuert, dass die Positionen der 15 Vertiefungen 5 des Objektträgers 4 mit den darin befindlichen Flüssigkeitstropfen 6 exakt den Positionen der Metallnetzchen 2 auf der Unterseite 1b der Trägerplatte 1 gegenüberliegen. Dabei wird die Trägerplatte 1 mittels eines Motors 21 der Transportvorrichtung 20 von oben parallel und seitlich zentriert, bis die Positionen von Metallnetzchen 2 und 20 der Flüssigkeitstropfen 6 gegenüberliegend übereinstimmen. Die Transportvorrichtung 20 nähert dann die Trägerplatte 1 an den Objektträger 4 an. Hierzu ist an der Transportvorrichtung 20 eine Schiene 22 vorgesehen, die die in einem Haltekopf 23 der Transportvorrichtung 20 über eine Halterung 9 eingespannte Trägerplatte 1, linear auf den Objektträger 4 absenkt. Die Objektträger 4 sind z.B. auf einer Fördereinrichtung 24 aufgelegt, die die Objektträger 4 in geeigneter Weise zu der 25 Transportvorrichtung 20 bewegt. Die Transportvorrichtung 20 und die Fördereinrichtung 24 werden über eine Computereinheit 25 und entsprechendes Computerprogramm gesteuert und geregelt.

Fig. 6 zeigt eine schematische Darstellung der erfindungsgemäßen Trägerplatte 1, die sich durch die Transportvorrichtung 20 (siehe Fig. 5), annähernd in Kontakt mit einem Objektträger 4 befindet. Auf der Unterseite 1b besitzt die Trägerplatte 1 markierte Positionen 2a, an denen in erhöhter Position Metallnetzchen 2 mit Gewebedünnnschnitten 2b positioniert sind. An der Oberseite 1a der Trägerplatte 1 befinden sich entgegengesetzt zu den Positionen der Metallnetzchen 2 Bohrungen 3a, in denen Magnete 3 stecken, um die Metallnetzchen 2 auf der Unterseite 1b der Trägerplatte 1 durch magnetische Kraft auf ihrem Platz 5 zu halten.

Bei einem bestimmten geringen Abstand zwischen der Unterseite 1b der Trägerplatte 1 und der Oberseite 4a des Objektträgers 4 benetzen die Flüssigkeitstropfen 6 die Gewebedünnnschnitte 2b auf den Metallnetzchen 2. Der Abstand ist dabei vom Volumen des Flüssigkeitstropfen 6 abhängig und variiert von 0,5 mm bis 4 mm. Der Transport der Trägerplatte 1 und des Objektträgers 4 wird mit einer Linearführung mit Schrittmotorantrieb (nicht dargestellt) durchgeführt. Die Positionen des Objektträgers 4 und der Trägerplatte 1 werden mit Positionssensoren 7 überwacht und entsprechend gesteuert. Zur Steuerung werden die Signale der verschiedenen Positionssensoren 7 verwendet. In der hier dargestellten Ausführungsform sind parallel angeordnete, vertikale Führungsschienen 8 vorgesehen, über die der Haltekopf 23 (siehe Fig. 5) zusammen mit der in einer Halterung 9 eingespannten Trägerplatte 1 auf den Objektträger 4 abgesenkt werden kann. Die Halterung 30 fixiert 10 die Trägerplatte 1 und jeweils einen Objektträger 4 zueinander in einer Behandlungsposition 14 (siehe Fig. 5). Dabei sind die Metallnetzchen 2, die einen Gewebedünnnschnitt 2b tragen, in Kontakt mit den Flüssigkeitstropfen 6 auf der Oberseite 4a des Objektträgers 4. Nach Ablauf 15 einer eingestellten Inkubationszeit wird automatisch der Wechsel der Trägerplatte 1 zum nächsten Arrangement von Flüssigkeitstropfen 6 20 25 30

auf demselben Objektträger 4 oder einem nächsten Objektträger 4 bewirkt. Die Trägerplatte 1 wird dazu automatisch angehoben und der Objektträger 4 um eine Stellung weiter transportiert. Dabei ist in Fig. 6 mit dem Pfeil A die vertikale Transportrichtung der Trägerplatte 1 und mit dem Pfeil B die horizontale Transportrichtung des Objektträgers 4 gekennzeichnet.

5

Der Ablauf des Transports der Objektträger 4 ist im weiteren nicht detailliert beschrieben und kann auf verschiedene Weise realisiert werden. Dem Fachmann sind beispielsweise folgende Anordnungen bekannt:

10 Die Objektträger 4 sind auf einer linearen Fördereinrichtung 24 aufgelegt, die durch einen Motor 26 bewegt wird. Alternativ befinden sich die Objektträger 4 auf einer kreisförmigen Fördereinrichtung 24 gelegt, die ebenfalls mit einem Motor angetrieben wird.

Um eine Volumenreduktion der Flüssigkeitstropfen 6 durch Verdampfen zu vermeiden sind die Objektträger 4 auf der Fördereinrichtung 24 mit einer Abdeckung 10 versehen, so dass dadurch eine Kammer 11 entsteht. In dieser Kammer 11 wird z.B. durch eingelegtes feuchtes Filterpapier 13 auf einer Halterung 12 eine hohe Luftfeuchtigkeit erreicht und die Verdampfung der Flüssigkeitstropfen 6 gering gehalten. Fig. 7 zeigt in einer schematischen Darstellung der Kammer 11 als Verdunstungsschutz der Flüssigkeitstropfen 6 auf dem Objektträger 4. In der Kammer befindet sich auf einer Halterung 12 ein Stapel feuchtes Fließpapier 13. Vor dem Kontakt der Flüssigkeitstropfen 6 mit den Metallnetzchen 2 wird die Abdeckung 10 automatisch zumindest teilweise geöffnet.

15

20

25

30

Fig. 8 zeigt eine schematische Darstellung einer anderen Ausführungsform der Kammer 10 als Verdunstungsschutz der Flüssigkeitstropfen 6 auf den Objektträgern 4. Die Kammer 4 als Verdunstungsschutz sieht in einer anderen Ausführungsform z.B. derart aus, dass sich das feuchte Filterpapier 13 in der Kammer 10 unterhalb des Objektträgers 4 befindet. Bei dieser Ausführungsform sind mehrere Kammern 10 überein-

- ander gestapelt. Dabei ist die nächste Kammer auf der darunter liegenden Kammer platziert und schließt somit diese ab. Die Feuchtigkeit des Filterpapiers 13 dringt von unten seitlich am Objektträger 4 vorbei in die Kammer 10. Der Objektträger 4 steht sozusagen auf Stelzen 28 im Sumpf. Die oberste Kammer 10 ist schließlich mit einem Deckel 27 abgeschlossen. Die Objektträger 4 werden in geeigneter Weise zu der Behandlungsposition 14 transportiert. In der Behandlungsposition wird die Trägerplatte 1 mit dem Objektträger in Kontakt gebracht.
- Die erfindungsgemäße Vorrichtung ist so angepasst, dass sie folgende Schritte eines bereits bestehenden Standardprotokolls zur immunologischen Markierung von Gewebedünnschnitten automatisch ausführt: Absättigen unspezifischer Bindungen, Antikörper-Inkubation, diverse Waschschritte mit verschiedenen Waschlösungen.
- In einer weiteren Ausführungsform ist an der Behandlungsposition die Anbringung einer Wärmequelle beispielsweise in Form einer kleinen elektrischen Widerstandsheizvorrichtung oder einer Kühleinheit vorgesehen, um die optimale Reaktionstemperatur des Objektträgers 4 und der Flüssigkeitstropfen 6 einzustellen. Diese ist so ausgebildet, dass ein elektrischer Kontakt des Objektträgers die Heiz- bzw. Kühlvorrichtung dieses Objektträgers auslöst. Die Steuerung der Wärmequelle bzw. der Kühleinheit erfolgt per Temperaturfühler am Objektträger 4 oder in der Nähe des Flüssigkeitstropfens und wird durch die geschlossene Computereinheit 25 und ein entsprechendes Computerprogramm reguliert. Die Erwärmung oder Kühlung der Objektträger 4 kann auch durch Kontakt der Objektträger 4 mit einer temperaturgeregelten, metallischen Platte 31 erfolgen.
- Gegenstand der Erfindung ist darüber hinaus ein Verfahren, mit dem unter Nutzung der beschriebenen Vorrichtung mehrere Metallnetzchen 2 mit darauf befindlichen Gewebedünnschnitten 2b auf einer Trägerplatte 1 zur Behandlung, im besonderen zur Durchführung von immu-

nologischen Markierungen und/oder Waschschriften in reproduzierbarer Qualität gleichzeitig effektiv und zeitsparend bearbeitet werden. Der automatisierte Arbeitsablauf reduziert die Fehlerquelle „Mensch“.

- Das Verfahren optimiert die Behandlung, im besonderen die Durchführung von immunologischen Markierungen und /oder Waschschriften von Gewebedünnsschnitten für elektronenmikroskopische Proben, die einzelnen Protokolle bezüglich Art der Flüssigkeit und Inkubationszeit sind dabei dem Stand der Technik zu entnehmen.
- Anstelle die Metallnetzchen 2 mit einer Pinzette von einem Flüssigkeits-tropfen 6 zum nächsten zu transportieren, werden die Gewebedünn-schnitte 2b auf Metallnetzchen 2 positioniert und auf die erfindungsge-mäße Trägerplatte 1, die markierte und erhöhte Positionen 2a aufweist und die auf der Unterseite 1b vorteilhafter weise hydrophob beschichtet ist, platziert. Die an der Oberseite 1a der Trägerplatte 1 befindlichen Magnete 3 halten die Metallnetzchen 2 durch magnetische Kraft auf ihrem Platz (siehe Fig. 6).
- Die Trägerplatte 1 wird mittels einer Transportvorrichtung 20 mit steuerbarer Hebe- und Senkfunktion (siehe Fig. 5) gehalten und auf die jeweiligen Objekträger 4 abgesenkt.
- Mit einer Mikroliterpipette werden Flüssigkeitstropfen 6 exakten Volumens in die Vertiefungen 5 des erfindungsgemäßen Objekträgers 4, eingefüllt. Die Positionen der Flüssigkeitstropfen 6 am Objekträger 4 liegen in der Behandlungsposition 14 den Positionen der Metallnetzchen 2 auf der Trägerplatte 1 genau gegenüber (siehe Fig. 6).
- Der Objekträger 4 ist auf der Fördereinrichtung 24 der Transportvorrichtung 20 aufgelegt. Die Einstellung einer bestimmten Temperatur des Objekträgers 4 und der Flüssigkeitstropfen 6 wird per Computer-einheit 25 durch eine Wärmequelle bzw. eine Kühleinheit (nicht darge-

stellt) die durch elektrischen Kontakt des Objektträgers ausgelöst werden gesteuert.

Die Transportvorrichtung 20 und die Fördereinrichtung 24 arbeiten derart zusammen, dass die Trägerplatte 1 mit den Metallnetzchen 2 parallel und seitlich bezüglich dem Objektträger 4 zentriert ist. Dabei stimmen die Positionen der Metallnetzchen 2 und die der Flüssigkeitstropfen 6 exakt gegenüberliegend überein. Die Abdeckung 10, die die Flüssigkeitstropfen 6 in einer Kammer 11 mit feuchtem Fließpapier 13 vor Verdunstung und dadurch bedingter Volumenreduktion schützt, wird automatisch zumindest teilweise geöffnet. Bei einem bestimmten geringen Abstand zwischen der Trägerplatte 1 und dem Objektträger 4 benetzen die Flüssigkeitstropfen 6 die Metallnetzchen 2. Diese Position wird nun für die jeweils programmierte Inkubationszeit konstant gehalten. Der Abstand ist vom Tropfvolumen abhängig und variiert von 0,5 mm bis 4 mm. Die motorbetriebene Transportmechanik der Fördereinrichtung 24 und die Transportvorrichtung 20 werden per Computereinheit 25, Computerprogramm und Positionssensoren 7 gesteuert.

Nach Ende der eingestellten Inkubationszeit erfolgt automatisch der Wechsel der Trägerplatte 1 zum nächsten Flüssigkeitstropfen 6. Die Trägerplatte 1 wird automatisch mit der Transportvorrichtung 20 und Sensorsteuerung 7 angehoben und der Objektträger 4 automatisch um eine Position weitertransportiert oder ein nächster Objektträger 4 mit Flüssigkeitstropfen 6 automatisch aus einer Linearführung mit mehreren Objektträgern einem Karussell, einer Kassette oder einem Stapel eingeführt.

Mit diesem Verfahren werden folgende Schritte eines Standardprotokolls zur immunologischen Markierung von Gewebedünnschnitten aus dem Stand der Technik mit mehreren Metallnetzchen 2 und darauf befindlichen Gewebedünnschnitten 2b gleichzeitig automatisch und reproduzierbar ausführt: Absättigen unspezifischer Bindungen, Antikör-

per-Inkubation, diverse Waschschrifte mit verschiedenen Waschlösungen.

Die Erfindung wurde in Bezug auf eine besondere Ausführungsform beschrieben. Es ist einem Fachmann jedoch klar, das Abwandlungen 5 und Modifikationen durchgeführt werden können, ohne den Schutzbereich der Ansprüche zu verlassen.

Bezugszeichenliste

- 1 Trägerplatte
- 1a Oberseite der Trägerplatte
- 1b Unterseite der Trägerplatte
- 5 2 Metallnetzchen
- 2a markierte Positionen auf der Trägerplatte
- 2b Gewebedünnnschnitte
- 3 Magnete
- 3a Bohrungen für Magnete
- 10 4 Objektträger
- 4a Oberseite des Objektträgers
- 4b Unterseite des Objektträgers
- 4c Kennzeichnung am Objektträger
- 5 Vertiefungen („wells“)
- 15 5a Teflonbeschichtung
- 6 Flüssigkeitstropfen
- 7 Positionssensoren
- 8 vertikale Führungsschiene der Transportvorrichtung
- 9 Halterung für Trägerplatte

- 10 Abdeckung des Objektträgers
- 11 Kammer
- 12 Halterung für Fließpapier
- 13 Stapel feuchtes Fließpapier
- 5 14 Behandlungsposition
- 20 Transportvorrichtung
- 21 Motor der Transportvorrichtung
- 22 Führungsschiene der Transporteinrichtung
- 23 Haltekopf
- 10 24 Fördereinrichtung
- 25 Computereinheit
- 26 Motor der Fördereinrichtung
- 27 Deckel
- 28 Stelze
- 15 29 gestrichelt-gepunktete Linie
- 30 Halterung der Transporteinrichtung
- 31 temperaturgeregelte Platte
- 32 gestrichelte Linie
- A Pfeil vertikale Transportrichtung
- 20 B Pfeil horizontale Transportrichtung
- D Dicke

Patentansprüche

- 1) Vorrichtung zur Behandlung von Gewebedünnschnitten (6) auf einer Trägerplatte (1) mit mindestens einer Behandlungsflüssigkeit dadurch gekennzeichnet, dass der Trägerplatte (1) gegenüberliegend ein Objekträger (4) in einer Behandlungsposition (14) zugeordnet ist, und dass mehrere Objekträger in diese Behandlungsposition (14) automatisch überführbar sind.
5
- 2) Vorrichtung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet dass die Trägerplatte (1) eine Unterseite (1b) definiert, an der markierte Positionen (2a) ausgezeichnet sind, an denen Metallnetzchen (2) mit Gewebedünnschnitten (2b) positioniert sind und eine Oberseite (1a) definiert, in der mehrere Bohrungen (3a) ausgebildet sind, in denen jeweils ein Magnet (3) steckt, wobei die Bohrungen (3a) den markierten Positionen (2a) gegenüberliegen.
10
- 3) Vorrichtung gemäß Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet dass, die Positionen (2a) für Metallnetzchen (2) auf der Unterseite (1b) der Trägerplatte (1) als Erhöhung ausgebildet sind.
15
- 4) Vorrichtung gemäß Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet dass, die Magnete (3) in den Bohrungen (3a) auf der Oberseite (1a) der Trägerplatte (1) Permanentmagnete oder Elektromagnete sind.
20

- 5) Vorrichtung gemäß Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet dass, die Trägerplatte (1) aus formstabilem Material, vorzugsweise aus Aluminium, Messing, faserverstärkten Kunststoffen, besteht.
- 5 6) Vorrichtung gemäß Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet dass, die Trägerplatte (1) auf der Unterseite (1b), die die Metallnetzchen (2) trägt hydrophob beschichtet ist.
- 10 7) Vorrichtung gemäß Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet dass, die Anordnung der markierten Positionen (2a) auf der Unterseite (1b) der Trägerplatte (1) auf denen die Metallnetzchen (2) sitzen, den Positionen der Vertiefungen (5) mit Flüssigkeitstropfen (6) auf der Oberseite (4a) des Objektträgers (4) gegenüberliegen.
- 15 8) Vorrichtung gemäß Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet dass, die Trägerplatte (1) über eine Halterung (9) am Haltekopf (23) an einer Transporteinrichtung (20) mit motorbetriebener Hebe- und Senk-Funktion angebracht ist.
- 20 9) Vorrichtung gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet dass die Transporteinrichtung (20) über eine angeschlossene Computereinheit (25) und Positionssensoren (7) automatisch gesteuert wird.
- 25 10) Vorrichtung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet dass der Objektträger (4) eine Oberseite (4a) definiert, die freie Vertiefungen (5) enthält, die zur Aufnahme von Behandlungsflüssigkeit (6) ausgebildet sind.

- 11) Vorrichtung gemäß Anspruch 1 und 10, dadurch gekennzeichnet dass, der Objektträger (4) aus transparentem formstabilem Material, vorzugsweise aus Glas oder faserverstärkten Kunststoff besteht.
- 5 12) Vorrichtung gemäß Anspruch 1 und 10, dadurch gekennzeichnet dass, der Objektträger (4) auf der Oberseite (4a), die die Vertiefungen (5) enthält hydrophob beschichtet ist.
- 10 13) Vorrichtung gemäß Anspruch 1 und 10, dadurch gekennzeichnet dass, die Tiefe der Vertiefungen (5) auf der Oberseite (4a) des Objektträgers (4) mit der Schichtdicke der Beschichtung übereinstimmt .
- 14) Vorrichtung gemäß Anspruch 1 und 10, dadurch gekennzeichnet dass, das Flüssigkeitsvolumen der Vertiefungen (5) des Objektträgers (4) 50 µl vorzugsweise 5 µl beträgt.
- 15 15) Vorrichtung gemäß Anspruch 1 und 10, dadurch gekennzeichnet dass, die Behandlungsflüssigkeit eine Markierungs- und/oder Waschlösung zur Durchführung von immunologischen Markierungstechniken für Gewebedünnschnitte ist.
- 20 16) Vorrichtung gemäß Anspruch 1 und 10, dadurch gekennzeichnet dass, der Objektträger (4) zur Kennzeichnung eine Speicherseinrichtung (4c) in Form eines Barcodes und/oder Chips aufweist.
- 25 17) Vorrichtung gemäß Anspruch 1 und 10 dadurch gekennzeichnet dass, die Positionen der Vertiefungen (5) mit den Flüssigkeitstropfen (6) auf der Oberseite (4a) des Objektträgers (4) in ihrer Anordnung den Positionen der Metallnetzchen (2) auf der Unterseite (1b) der Trägerplatte (1) gegenüberliegen.

- 18) Vorrichtung gemäß Anspruch 1 und 10, dadurch gekennzeichnet dass, sich der Objektträger (4) auf einer Fördereinrichtung (24) befindet, die über eine Führungsschiene (22) und einen Motor (26) eine Behandlungsposition einstellt.
- 5 19) Vorrichtung gemäß Anspruch 1 und 10, dadurch gekennzeichnet dass, die Steuerung der Fördereinrichtung (24) über eine angeschlossene Computereinheit (25) und Positionssensoren (7) automatisch erfolgt.
- 10 20) Vorrichtung gemäß Anspruch 1 und 10 dadurch gekennzeichnet dass der Objektträger (4) auf der Fördereinrichtung (24) mit einer automatisch wenigstens teilweise zu öffnenden Abdeckung (10) versehen ist, so dass dadurch eine Kammer (11) entsteht.
- 15 21) Vorrichtung gemäß Anspruch 20 dadurch gekennzeichnet dass die Kammer (11) eine Halterung (12) aufweist, in die feuchtes Fließpapier (13) eingelegt wird, so dass in der Kammer (11) eine hohe Luftfeuchtigkeit entsteht und die Verdampfung der Flüssigkeitstropfen (6) auf den Objektträgern (4) gering ist.
- 20 22) Verfahren zur Behandlung von Gewebedünnnschnitten auf einer Trägerplatte (1) mit mindestens einer Behandlungsflüssigkeit, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte: Befüllen mindestens eines Objektträgers (4), auf dem sich Vertiefungen (5) befinden, mit einer Behandlungsflüssigkeit (6); Verbringen des Objektträgers (4) in eine Behandlungsposition; Absenken und die Trägerplatte (1) auf den Objektträger (4), wobei ein Kontakt zwischen der Behandlungsflüssigkeit (6) und den Gewebedünnnschnitten (2b) hergestellt wird und automatisches Wechseln der Objektträger (4) zu einer nächsten Behandlungsposition.
- 25

- 23) Verfahren gemäß Anspruch 22 gekennzeichnet dadurch dass die Behandlung der Gewebedünnschnitte (2b) immunologische Markierungsreaktionen und /oder Waschschritte darstellt.
- 24) Verfahren gemäß Anspruch 22 gekennzeichnet dadurch dass die Behandlung der Gewebedünnschnitte (2b) automatisch durchgeführt wird.
5
- 25) Verfahren gemäß Anspruch 22 gekennzeichnet dadurch dass sich die Gewebedünnschnitte (2b) auf Metallnetzchen (2) befinden, die auf markierten und erhöhten Positionen (2a) der Unterseite (1b) der erfundungsgemäßen Trägerplatte (1) sitzen und durch Magnete (3) an der Oberseite (1a) der Trägerplatte (1) auf ihrem Platz gehalten werden.
10
- 26) Verfahren gemäß Anspruch 22 gekennzeichnet dadurch dass die Trägerplatte (1) mittels einer Halterung (9) an einem Haltekopf (23) einer Transportvorrichtung (20) mit automatischer Hebe- und Senkfunktion befestigt wird.
15
- 27) Verfahren gemäß Anspruch 22 gekennzeichnet dadurch, dass die Vertiefungen (5), die sich auf der Oberseite (4a) des Objektträgers (4) befinden, mit einer Markierungs- und/oder Waschlösung zur Durchführung von immunologischen Markierungstechniken für Gewebedünnschnitte gefüllt sind.
20
- 28) Verfahren gemäß Anspruch 22 gekennzeichnet dadurch, dass die Transportvorrichtung (20) mit automatischer Hebe- und Senkfunktion den Objektträger (4) in eine Behandlungsposition bringt, in der die Flüssigkeitstropfen (6) in den Vertiefungen (5) auf der Oberseite (4a) des Objektträgers (4) exakt den Gewebedünnschnitten (2b) auf den Metallnetzchen (2) auf der Unterseite (1b) der Trägerplatte (1) gegenüberliegen.
25

- 29) Verfahren gemäß Anspruch 22 gekennzeichnet dadurch, dass sich der Objektträger (4) auf einer Fördereinrichtung (24) befindet, die über eine Führungsschiene (22) und einen Motor (26) in eine Behandlungsposition bewegt wird.
- 5 30) Verfahren gemäß Anspruch 22 gekennzeichnet dadurch dass die Steuerung der Transportvorrichtung (20) über eine Computereinheit (25) und Positionssensoren (7) erfolgt.
- 10 31) Verfahren gemäß Anspruch 22 gekennzeichnet dadurch dass die Steuerung der Transportvorrichtung (20) so eingestellt ist, dass die Trägerplatte (1) an den Objektträger (4) annähert wird und die Gewebedünnnschnitte (2b) auf den Metallnetzchen (2) in Kontakt mit den Flüssigkeitstropfen (6) auf dem Objektträger (4) kommen.
- 15 32) Verfahren gemäß Anspruch 22 gekennzeichnet dadurch dass vor dem Kontakt der Gewebedünnnschnitte (2b) auf der Trägerplatte (1) mit den Flüssigkeitstropfen (6) auf dem Objektträger (4) die Abdeckung (10) der Objektträger (4) automatisch zumindest teilweise geöffnet wird.
- 20 33) Verfahren gemäß Anspruch 22 gekennzeichnet dadurch dass der Kontakt der Gewebedünnnschnitte (2b) auf der Trägerplatte (1) mit den Flüssigkeitstropfen (6) auf dem Objektträger (4) über eine beliebige Inkubationszeit gehalten wird.
- 25 34) Verfahren gemäß Anspruch 22 gekennzeichnet dadurch dass nach Ablauf der Inkubationszeit die Trägerplatte (1) automatisch entlang der Führungsschienen (8) gehoben wird und der Objektträger (4) auf der Fördereinrichtung (24) über eine motorbetriebene Führungsschiene (22) automatisch in eine andere Behandlungsposition wechselt.

- 35) Verfahren gemäß Anspruch 22, gekennzeichnet dadurch, dass die Trägerplatte (1) eine Unterseite (1b) definiert, an der markierte Positionen (2a) ausgezeichnet sind, an denen Metallnetzchen (2) mit Gewebedünnnschnitten (2b) positioniert sind und eine Oberseite (1a) definiert, in der mehrere Bohrungen (3a) ausgebildet sind, in denen jeweils ein Magnet (3) steckt, wobei die Bohrungen (3a) den markierten Positionen (2a) gegenüberliegen.
- 5
- 36) Verfahren gemäß Anspruch 22, gekennzeichnet dadurch, dass der Objektträger (4) eine Oberseite (4a) definiert, die freie Vertiefungen (5) enthält, die zur Aufnahme von Behandlungsflüssigkeit (6) ausgebildet sind.
- 10

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Vorrichtung und ein Verfahren zur optimierten und automatisierten Durchführung von immunologischen Markierungstechniken für Gewebedünnschnitte (2b). Dabei wird 5 eine durch eine computergesteuerte Transportvorrichtung (20) automatisch bewegliche Trägerplatte (1) auf der mehrere Gewebedünnschnitte (2b) auf Metallnetzchen (2) positioniert sind, wie ein Stempel in eine Flüssigkeit aus Wasch- oder Markierungslösung (6) getaucht, die sich 10 in mehreren Vertiefungen (5) in einem ebenfalls automatisch beweglichen Objektträger (4) befinden.

Fig. 6

1/4

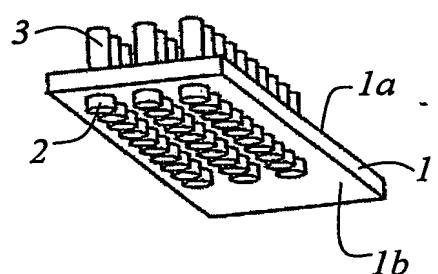


Fig. 1

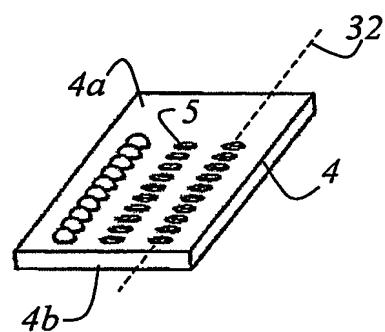


Fig. 2

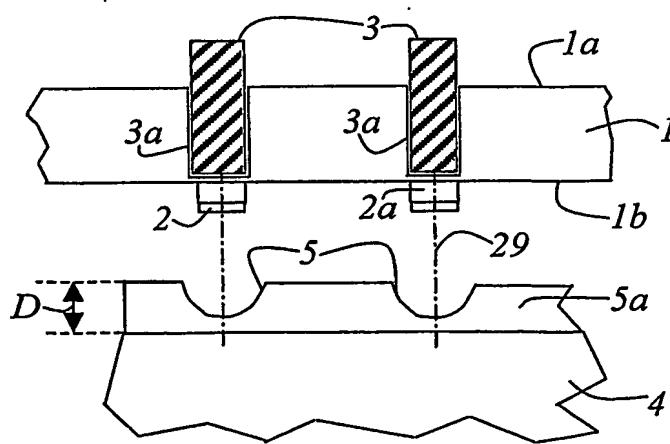


Fig. 3

2/4

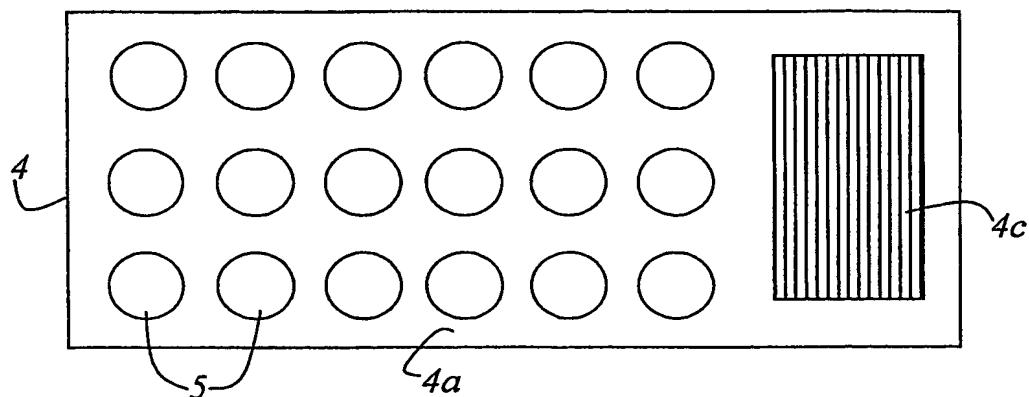


Fig. 4

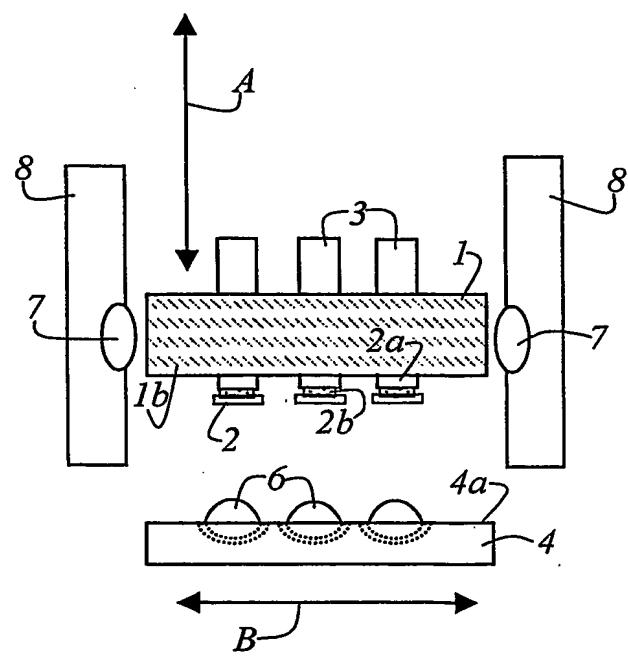


Fig. 6

3/4

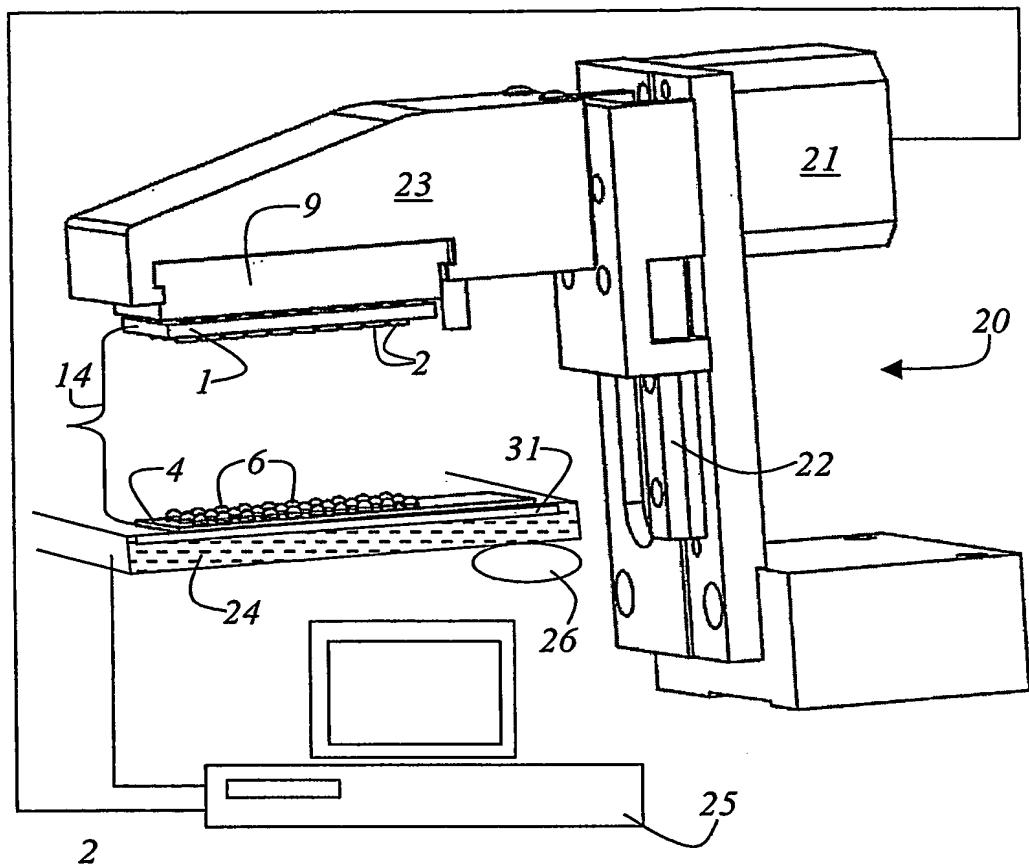


Fig. 5

4/4

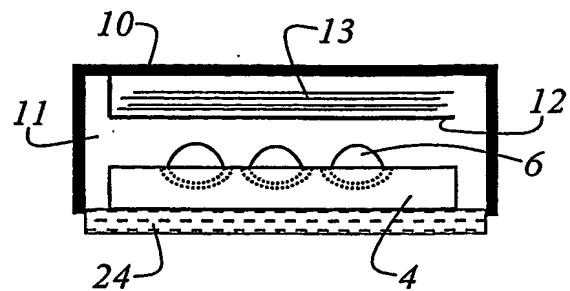


Fig. 7

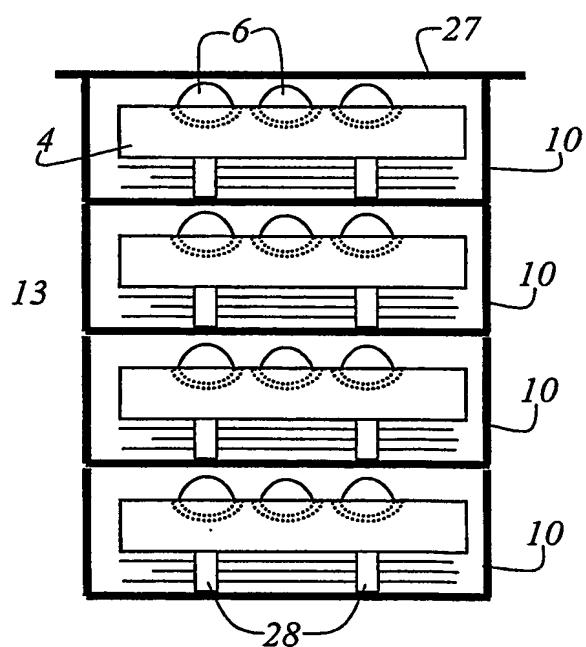


Fig. 8

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.